

文章编号:1000-582X(2004)02-0120-05

黄酮类抗氧化剂的构-效关系*

刘杰,王伯初,彭亮,张广求

(重庆大学生物工程学院教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400030)

摘要:天然黄酮是广泛存在于自然界的酚类抗氧化剂之一,其抗氧化活性与清除自由基的能力密切相关。综述了几种研究抗氧化剂活性中常用的自由基检测方法与评价指标,并详细分析了结构因素影响黄酮类化合物抗氧化活性的机制与规律。认为黄酮类化合物的抗氧化活性主要取决于羟基的相对位置而非数目,具有色原酮结构的黄酮2-3位上饱和双键也会在一定程度上增强其抗氧化活性,C环吸电子性质或羟基成醚则会使天然黄酮抗氧化能力降低,与金属离子的络合也是黄酮阻止自由基氧化的途径之一。对黄酮类抗氧化剂构-效关系的研究为筛选高效抗氧化剂和天然黄酮的结构修饰提供了理论依据。

关键词:黄酮;抗氧化活性;构-效关系;自由基清除

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

生物体在自身的新陈代谢过程中会产生大量的活性氧自由基,当这些自由基无法通过正常途径及时清除时,就会引发各种疾病。根据目前的研究结果,人类大部分常见疾病几乎都与氧自由基有关,包括心脑血管疾病、癌症、早老性痴呆、震颤麻痹症等^[1]。另外,食品在存放过程中,除了微生物分解会使其腐败外,光照所产生的过氧阴离子自由基的氧化作用也是食品变质的重要原因。可以说生物体系中的大部分氧化作用都与自由基有关。活性氧自由基的破坏作用是通过一系列链式反应实现的,反应一旦启动将无休止地进行下去,引发组织或食品的不断氧化消耗,其结果是破坏性和不可逆转的。除非加入抗氧化剂,使已生成的自由基猝灭,以终止链反应。传统的合成抗氧化剂虽然抗氧化能力都比较强,但是自20世纪70年代以来,人们不断发现合成抗氧化剂有一定毒性,甚至可以致畸、致癌,因此越来越多的国家开始限制或禁止使用某些合成抗氧化剂,所以天然抗氧化剂的地位日见重要。而多酚类物质中的黄酮又因其在自然界中的广泛分布,抗氧化活性强而倍受关注。

目前已有报道的天然黄酮类化合物有9大类,近3000多个^[2],各类间,以及每一类中不同的黄酮单体其抗氧化活性有较大差异^[3-5]。这是因为黄酮类化合物清除自由基的能力由化学结构所决定。认清其中的构-效关系,对于筛选高效的药物及食品抗氧化剂具

有重要的指导意义,同时也为天然黄酮的合成和结构修饰提供了理论基础。

1 自由基清除能力的评价指标和研究方法

评价一个物质的抗氧化活性通常是看它对自由基的清除能力,多以抑制率I或半抑制浓度 I_{50} 作为衡量指标。因此,操作中就涉及到自由基的检测问题。最直接和有效的方法是电子顺磁共振(ESR)技术,可以根据样品ESR信号吸收峰面积,用比较法求出加入抗氧化剂后的样品中的自由基相对浓度,经过相应计算可以得到I与 I_{50} 的值。但是,自由基一般都不稳定,寿命很短,用ESR技术测量瞬时自由基浓度不够方便和准确。因此实际应用得比较多的是自旋捕集技术,即用DMPO、PBN、tNB等自旋捕集剂,将未被清除掉的自由基捕捉到,使生成寿命较长的自旋加合物,再用ESR检测^[5]。另外,化学发光法^[1,6]利用活性氧使发光增效剂luminol激发而发光的原理来检测活性氧自由基,比较快速、灵敏,而且操作简单,价格低廉,应用也比较广泛。但是该方法极易受氧化剂,甚至是二价铁离子等的干扰而产生较大的误差。以上几种都是物理方法检测自由基,另有一类化学方法,使氧自由基与其特异性清除剂反应,生成具有特定光吸收或荧光的

* 收稿日期:2003-10-10

作者简介:刘杰(1979-),女,山东青岛人,重庆大学硕士研究生,主要从事天然药物药理方面研究。

物质,对该物质进行检测,从而可以间接地检测出氧自由基的含量^[7-8]。

张红雨^[4]等人用量子化学的方法计算抗氧化剂与抽氢反应生成的自由基的生成热之差,即 ΔHOF ,以此作为评价抗氧化剂活性的指标。 ΔHOF 值越低,说明抽氢反应越容易进行,生成的自由基越稳定, O—H 键越弱,因此抗氧化剂活性越高。而张英^[9]、Helle^[10]、Pamela^[11] 等学者则以抗氧化剂单体清除活性氧的反应速率常数 K_3 为比较指标,测定了黄酮类单体的 K_3 在 $10^{-5} \sim 10^{-6} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 之间。国际上还有一个用的比较多的指标是 TEAC,即 1 mmol/L 天然抗氧化剂的抗氧化能力相当于 Trolox (一种合成抗氧化剂) 同等能力的浓度数。

2 构-效关系

黄酮类物质在抗氧化反应中,不仅可以清除引发链反应的活性自由基和起催化作用的金属离子,还能直接捕捉链传递阶段的过氧自由基,阻断链反应,是很好的预防型和阻断型抗氧化剂。影响类黄酮抗氧化活性的结构因素有很多,其中主要包括:羟基取代模式和位置,羟基成甙甲基化, $\Delta^{2(3)}$ 双键,C 环电子性质等。

2.1 邻位酚羟基的重要性

黄酮通过抽氢反应清除自由基的能力取决于反应后生成的新自由基的稳定性。如果以 ΔHOF 作为指标,则值越低其抗氧化活性就越高。研究工作者对 10 多种黄酮类化合物的 ΔHOF 进行了计算,发现邻苯二酚的 ΔHOF 比间苯二酚的 ΔHOF 低 14 kJ/mol 左右,而联苯三酚 2 位酚羟基则比邻苯二酚 ΔHOF 低 9 kJ/mol 左右^[12]。即抗氧化活性顺序:联苯三酚 > 邻

二酚羟基 > 间位酚羟基。这种预测与实验所得的结论是一致的。杨梅素、槲皮素及桑色素三者结构上 A、C 环完全一致,差别仅在于 B 环酚羟基的相对位置和数量上,如图 1。自由基清除实验已经证明,它们的抗氧化活性顺序:杨梅素 > 槲皮素 > 桑色素^[13]。之所以呈现这种规律,是因为生成的苯氧自由基与邻位羟基形成了分子内氢键,使未成键的电子与部分质子化了的氢原子之间相互吸引,从而保持了自由基结构的稳定性,如图 2。除此之外,当形成自由基时,相邻酚羟基 C—O 键键级在 1.15 左右,具有部分双键的性质,可能形成了可共振的半醌式结构。未成对电子的电子云在半醌式结构中有更分散的分布,所以也更稳定。这个过程可以表示为图 3。所以,邻二酚羟基形成自由基后的稳定性来源于以上两个方面,但氢键的作用应该更为重要。联苯三酚的活性尚比邻二酚羟基大,是因为在氧自由基的邻位有两个羟基,使氧上未成对电子可参与两个氢键,从而更加稳定。而具有单羟基或间位羟基的黄酮,由于 ΔHOF 要大的多,形成的自由基不够稳定,因此几乎没有抗氧化作用。也有学者认为黄酮的抗氧化活性取决于羟基的数目,这固然是一个方面,因为羟基多了毕竟反应的活性位点增多,但仅以羟基的数目作为评价标准是不够的,如前所述,单羟基或间位羟基的 ΔHOF 值很大,几乎没有抗氧化作用,所以即使黄酮的分子结构中有很多羟基,但不能形成有效的稳定自由基结构也是没有用的。因此,反应活性位点的增多不代表抗氧化活性升高,黄酮类抗氧化剂的活性与羟基的多少没有直接的关系,而是取决于羟基的相对位置。这是所有决定黄酮清除自由基活性因素中的首要因素。

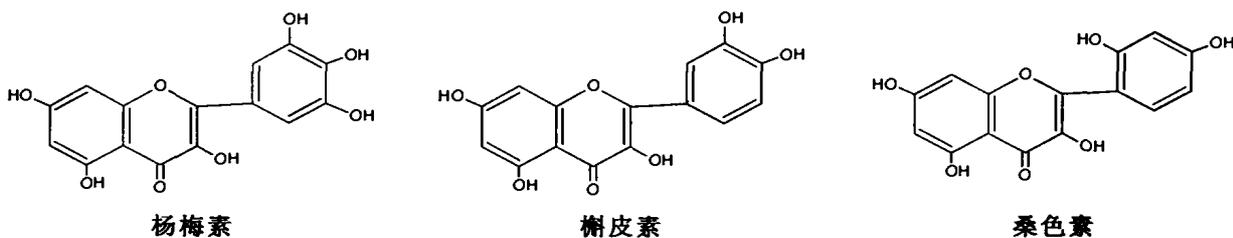


图 1 杨梅素,槲皮素,桑色素的分子结构式

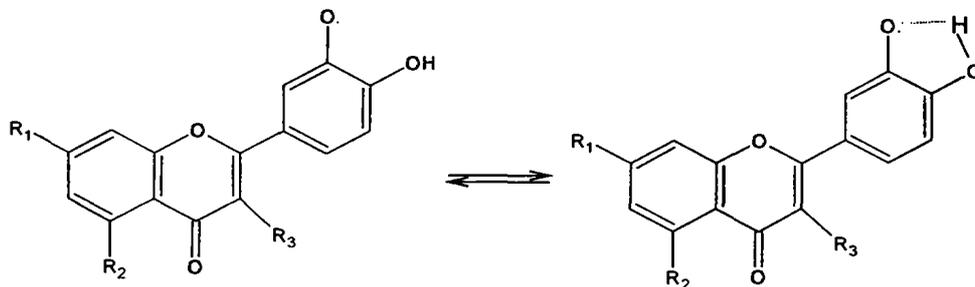


图 2 分子内氢键对苯氧自由基的稳定作用

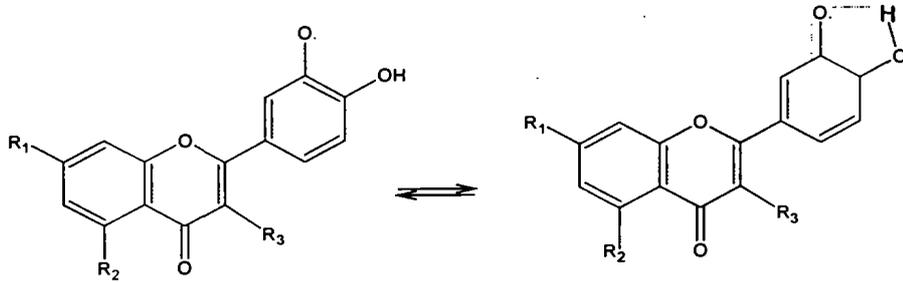
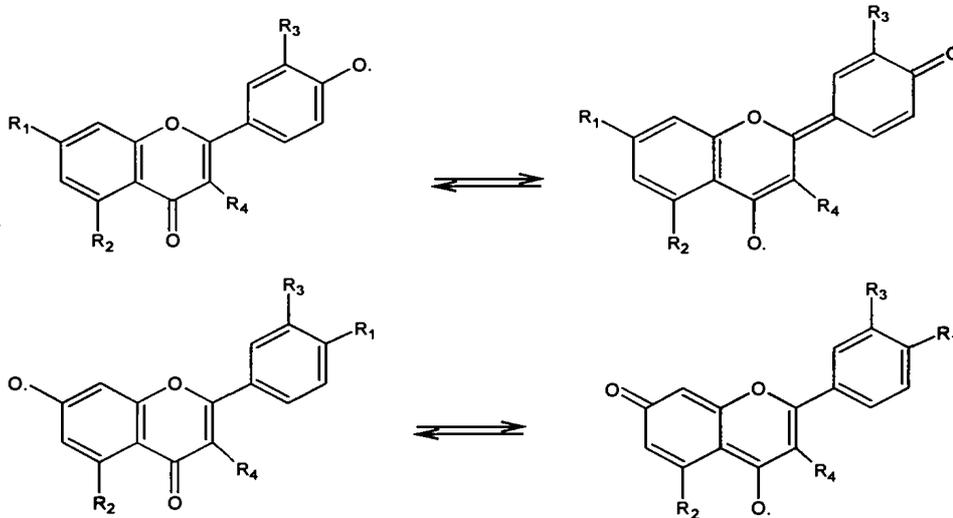


图3 共振的半醌式结构使苯氧自由基更加稳定

2.2 $\Delta^{2(3)}$ 双键的作用

具有色原酮结构的黄酮2-3位上为不饱和双键。关于此双键的作用存在分歧^[13-14],但大多数人认为 $\Delta^{2(3)}$ 双键的存在延长了A、B环的共轭体系,使苯氧自由基更加稳定。特别是对于4'位和7位羟基, $\Delta^{2(3)}$ 双键的存在使该位置上的自由基参与了更长的共轭体系,整个分子通过 π 键移动形成共振,从而大大增强了稳定性,如图4所示。当双键氢化后,这种延

长的共轭体系被打断,相应地抗氧化活性也会有不同程度的下降^[14]。但是从另一方面来看,双键氢化增强了C环的供电子性质和整个分子的脂溶性,这对于A、B环上酚羟基的抗氧化活性又是有利的,如没有 $\Delta^{2(3)}$ 双键的毒叶素和含有 $\Delta^{2(3)}$ 双键的栝精,抗氧化性几乎相同^[15]。但是这种增效作用一般情况下影响比较小,所以总体表现的多是双键饱和降低抗氧化活性。

图4 $\Delta^{2(3)}$ 双键延长了A、B环的共轭体系

2.3 C环性质的影响

除了 $\Delta^{2(3)}$ 双键和3-羟基,4-羰基以外,C环的电子性质也是影响黄酮抗氧化活性的因素。总的来说,当C环表现为供电子的性质时,会使A、B环羟基的活性升高,反之,则会使之削弱。以槲皮素(图1)和儿茶素(图5)比较,儿茶素C环饱和,因而具有供电子效应,而槲皮素C环具有不饱和双键和羰基而具有的吸电子效应,所以,无论是A环还是B环上的羟基,儿茶素都比相应的槲皮素具有更低的 ΔHOF 值^[16]。而对于C环电子性质的感受,A环要比B环敏感。知母宁是一个很好的例子(如图5),其A、B、C三环共轭程度很高,C环的吸电子性质使A环酚羟基的 ΔHOF 值

升高30 kJ/mol,而仅使B环酚羟基的 ΔHOF 升高8 kJ/mol左右。可以预测,对于其他结构的黄酮,这种差异应该更加显著。因为在黄酮类化合物中,A、C环平面夹角仅 26° 左右,尤其是具有色原酮结构的黄酮,A环和C环的共轭程度特别高,而B环与C环之间以键级为0.992左右的 δ 键相连,其扭转势能垒只有26 kJ/mol^[16],共轭程度较低,所以不会像A环那样强烈地感受到C环电子性质的影响。当然,C环对黄酮抗氧化活性的影响是 $\Delta^{2(3)}$ 双键、3-羟基、4-羰基,以及电子性质等多种因素共同作用的结果,在实际问题中应该将几个因素综合起来考察。

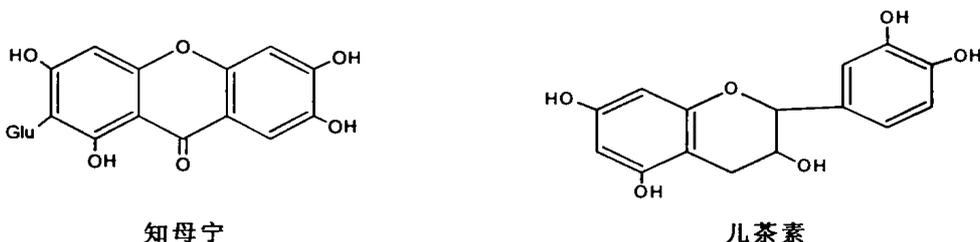


图 5 知母宁与儿茶素分子结构

2.4 B 环比 A 环的抗氧化活性强

当涉及到黄酮类物质清除自由基的问题时,习惯将 B 环作为分子的反应活性中心,而对于 A 环的作用往往不是很重视,原因可从以下两个方面解释:1) 天然黄酮 A 环的酚羟基大多处于间位或只有单羟基,而不像 B 环那样很多都具有邻二酚羟基,根据前面 2.1 的分析,不难理解其抗氧化能力是低于 B 环的。2) 根据 2.3 的讨论,A 环容易受到 C 环电子性质的影响,而除儿茶素等少量黄酮外,天然黄酮的 C 环大多是不饱和的,或具有羰基,或具有双键,也就是说,C 环表现为吸电子性质。因此,将进一步削弱 A 环上酚羟基的活性。可以想像,如果 C 环推电子,特别是 A 环上具有邻二酚羟基,那么 A 环也应该具有相当的抗氧化活性。黄芩素 B 环无取代,A 环上有一对相邻的羟基,而抗氧化活性仍比较高,清除自由基的反应速率常数 K_3 为 $5.6 \times 10^6 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,半抑制浓度 I_{CSO} 为 $0.52 \mu\text{mol/L}$ ^[9]。

2.5 与金属离子的络合

与金属离子络合是黄酮类化合物抗氧化的又一途径。金属离子常常参与自由基反应,生成毒性更大的物质。在 H_2O_2 通过 Fenton 反应变成 $\cdot\text{OH}$ 的过程中, Fe^{2+} 就是反应物之一。在油脂的自动氧化过程中,过渡金属离子也起着非常重要的作用^[17],微量的金属离子可以使油脂氧化的诱导速率提高 10^{36} 倍。黄酮的 3-羟基-4-羰基,或者 4-羰基-5-羟基结构具有强烈的螯合金属离子的作用,形成稳定的五元环或六元环,其络合物结构如图 6 所示。在这种抗氧化机制中,4-羰基的存在非常重要。虽然邻二酚羟基也有微弱的络合金属离子的趋势,但其通过抽氢反应以发挥抗氧化活性占主导地位。

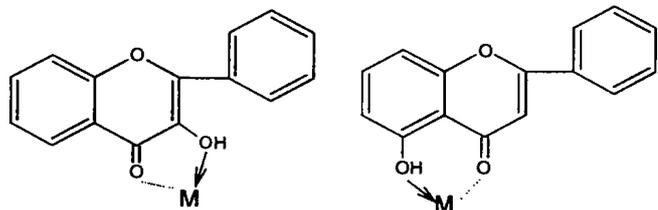


图 6 黄酮对金属离子的螯合作用

也有学者指出,某些黄酮络合了金属离子以后也具有清除自由基的能力^[11]。黄芩甙铜清除羟基自由基能力与黄芩甙相似,黄芩甙锌清除羟基自由基能力

则明显大于黄芩甙,它们的半抑制浓度 I_{CSO} 分别是黄芩甙 $7.8 \mu\text{mol/L}$,黄芩甙铜 $8.0 \mu\text{mol/L}$,黄芩甙锌 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。在这里,有可能反应的活性中心从羟基转移到了金属离子。

2.6 关于羟基成甙

一般来说,羟基成甙会使黄酮的抗氧化活性下降甚至完全消失。槲皮素 3 位羟基与芸香糖成甙变成芦丁后,抗氧化值 (TEAC) 从 4.7 ± 0.1 下降到 2.4 ± 0.06 ;橙皮素 TEAC 值为 2.1 ± 0.05 ,当 4' 位羟基与葡萄糖成甙时,TEAC 下降到 1.74 ± 0.09 ,当 3' 与 7 位羟基同时与葡萄糖成甙时,则下降到 0.79 ± 0.04 ^[18]。而在 Takato, Yokozawa^[8] 等人的实验中,山奈素的 3 种糖甙物的 I_{CSO} 值都大于 $500 \mu\text{mol/L}$,抗氧化力几乎为零。在同一实验体系中,同一位上的羟基与不同的糖成甙,产物的抗氧化活性也不同。金丝桃甙、泽漆新甙、芦丁唯一的区别在于它们 C 环上 3 位羟基分别被半乳糖、双半乳糖、芸香糖甙化,而在清除 H_2O_2 的体系中,其 I_{CSO} 分别是 $0.87 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.8 \mu\text{mol/L}$ 和 $8.5 \mu\text{mol/L}$ ^[3]。

黄酮类物质羟基成甙后抗氧化活性降低,主要有以下 3 个方面的原因:1) 糖取代了原来羟基上氢的位置,使可参与抽氢反应的羟基减少,从而导致了清除自由基能力的下降。2) 某些黄酮的 3 位或 5 位羟基成甙后,原来的分子失去了络合过渡金属离子的能力,使一些与金属离子有关的氧化反应得以顺利引发,这在油脂的氧化模型中体现的最为明显。3) 单糖或多糖总是一个比较大的基团,而自由基反应必须在一定的距离内才能进行,糖的空间位阻效应使得黄酮类抗氧化剂无法与活泼自由基接近。

3 总结与展望

对黄酮清除自由基的能力进行研究,并充分认识天然黄酮抗氧化作用的构-效关系,对于筛选高效药物和食品抗氧化剂具有重要的指导意义,同时也为黄酮的分子修饰和人工合成提供了理论方向。目前对于黄酮类抗氧化剂的结构修饰多集中于增加其脂溶性,以便提高在油脂等食品中的分散能力和透过细胞膜的能力,从而更充分的发挥抗氧化作用。根据前面构-效关系的论述,笔者认为,要从根本上提高类黄酮的抗氧化能力,应着重于 B 环邻位酚羟基或其前体化合物的构建,并在此基础上增加邻位酚羟基的数目,这样不仅增加了自由基清除活性位点的数目,也使反应

活性更高。

目前对于抗氧化活性的研究有多种实验方法和理论体系,然而都还不十分完善。在实验测定黄酮类化合物清除自由基效率时,实验体系或考察指标不同会得到差异性很大的结果^[9]。而理论计算尚处于探索阶段,在方法上还有许多不足之处。因此,为了合理地评价天然抗氧化剂,包括黄酮的活性,并确保结果的重现性与可靠性,建立一个客观、全面、综合的实验模型是必要的,并与理论相结合,客观地研究其构-效关系。

参考文献:

- [1] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [3] 陈季武, 朱振勤, 杭凯, 等. 八种天然黄酮类化合物抗氧化构效关系[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2002, 1: 91-94.
- [4] ZHANG HONG - YU, CHEN DE - ZHAN. Theoretical elucidation on activity difference of ten flavonoid antioxidants [J]. Acta Biochimica Biophysica Sinica, 2000, 32 (4): 317-321.
- [5] ZHANG HONG - YU, GE NAN, ZHANG ZHI - YI. Theoretical elucidation of activity differences of five phenolic antioxidants [J]. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20(4): 363-366.
- [6] 于善凯, 张英. 不同品种杭白菊中酚类物质含量和清除自由基活性比较[J]. 营养卫生, 2001, 22(4): 84-87.
- [7] YINRONG L, YEAP F. Antioxidant activity of polyphenols from Sage [J]. Food chemistry, 2001, 75: 197-202.
- [8] TAKATO Y, CUI P, ERBO D, et al. Study on the inhibitory effect of tannis and flavonoids against the DPPH radical [J]. Biochemical pharmacology, 1998, 156: 213-222.
- [9] 张英, 吴晓琴, 丁宵霖. 黄酮类化合物结构与清除活性氧自由基效能关系的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 10(4): 26-33.
- [10] HELLE M, CHARLOTTE J, LEIF H, et al. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies [J]. Eur Food Res Technol, 2000, 211: 240-246.
- [11] PAMELA P, LAURA M, HOLKERI H, et al. Antioxidant activity of (+) - catechin. Rate constant for hydrogen - atom transfer to peroxy radicals [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 213: 405-408.
- [12] 张红雨, 陈德展. 酚类抗氧化剂清除自由基活性的理论表征与应用 [J]. 生物物理学报, 2000, 16(1): 1-8.
- [13] HUSAIN S, CILLARD J, CILLARD P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. Phytochemistry, 1987, 26(9): 2487-2491.
- [14] 白凤梅, 蔡同一. 类黄酮生物活性及其机理的研究进展 [J]. 食品科学, 1999, 8: 11-13.
- [15] 黄池宝, 罗宗明, 宾丽英. 黄酮类化合物抗氧化性与其结构关系的研究 [J]. 广东工业大学学报, 2000, 17(2): 71-75.
- [16] 张红雨. 黄酮类抗氧化剂结构-活性关系的理论解释 [J]. 中国科学(B辑), 1999, 29(1): 91-96.
- [17] 翁新楚. 脂类的空气氧化 [J]. 中国粮油学报, 1993, 8(3): 22-28.
- [18] 林亲录, 施兆鹏. 类黄酮与酚酸等天然抗氧化剂的结构与其抗氧化力的关系 [J]. 食品科学, 2001, 22(6): 85-91.

Structure - activity Relationship of Flavonoids Antioxidants

LIU Jie, WANG Bo-chu, PENG Liang, ZHANG Guang-qiu

(Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Flavonoids is one of the phenolic antioxidants widely existing in nature, whose antioxidant activity is relative to radical scavenging ability. Several radical detection methods and indexes used in the antioxidants' activity research are introduced. Furthermore, the mechanism and rule how the chemical structure factors influence the antioxidant activity of flavonoids are analyzed in detail. The antioxidant activity mainly lies on the relative position other than amount, of hydroxyls. $\Delta^{2(3)}$ unsaturated bond can enhance the activity in a certain extent. But the electronic scarcity property of C - ring, and hydroxyl glycosylation will make the antioxidant of nature flavonoids decrease. In addition, combining with metal ion is another approach the flavonoids prohibiting the formation of radical. Research in the structure - activity relationship of flavonoids antioxidant may provides theoretical basis for structural modification of natural flavonoids and selecting highly efficient antioxidants.

Key words: flavonoids; antioxidant activity; structure - activity relationship; radical scavenging

(编辑 李胜春)